

## Gynogenèse *in vitro* chez quelques variétés de blé dur du Maghreb et du Moyen Orient (*Triticum durum* L.) pour l'obtention de régénérants chlorophylliens, en conditions de stress salins

**In vitro gynogenesis in some varieties of durum wheat of Maghreb and Middle East (*Triticum durum* L) as a tool for regenerating plants from salt tolerant callus lines**

MANSOURI<sup>1</sup> Sonia, KOBALISSI<sup>2</sup> Ahmad, NZIENGUI<sup>2</sup> Hugues, FAKIRI<sup>3</sup> Malika, SHEKAFANDEH<sup>2</sup> Akhtar et SIBI<sup>2</sup> Monique L.

**Abstract:** Salt tolerance is a very needed potentiality in cereal crops, since it would allow to extend cultures to dryer areas. The biotechnological approach and more precisely, *in vitro* tissue culture, has been experimented, using gametophytic (either male or female) tissues as source of variability. In cereals, albinism is frequently associated to androgenesis, but seldom occurs after gynogenesis. Thus, in durum wheat, we chose gynogenesis as to get callus lines able to regenerate in sodium chloride stress conditions and to express specific variability.

Regeneration from tissue cultured in stress conditions, should result in plants exhibiting the same tolerance potentialities as those of the callus lines. Direct heavy stress application should be expected to result in screening monogenic mutant cells, easy to revert, while gradual application should imply progressive adaptation through modifications, occurring at multiple biological levels, more difficult to revert.

In *T. durum*, gynogenesis technical has been investigated on six cultivars, Cocorit, Isly, Jori, Oued Zenati, Sarif, issued from Morocco, and ChamI from Syria. The spikes were harvested when microspores were at bi or trinucleate stage. After 4°C cold pretreatment of 7, 11 or 15 days, they were sterilized, and the excised ovaries were placed in 5.5 cm Petri dishes containing an "induction" medium (A or B), i.e. inducing cell division in the female gametophyte. After four to nine weeks in dark conditions, the swelling ovaries bursted under the pressure of the growing call. These were excised and transferred to a "differentiation" medium, and the regenerated shoots were placed on a "developmental" followed by a "rooting" medium to give haploid plantlets through this "first phase" of regeneration.

The results presented here, stem from two series of experiments and are based on the culture of 4,786 unfertilized ovaries, out of more than 22,000 that were plated in all the experiments.

Through the "first phase" of gynogenesis, the best plant regeneration ratios, out of 100 cultivated ovaries, were obtained for Isly (21.9%), after 7 days of cold pretreatment, associated to A induction medium (7d, /A) and for Cocorit (15d, /A), with 18.1%. For Jori, good results were obtained in three situations: (7d, /B) with 9.3%, (7d, /A) with 16%, and (11d, /B) with 17.1%. After the first phase, on the whole experiments, a total of 191 plants were obtained: 90 for Isly, 74 for Jori, 19 for Cocorit, 7 for Oued Zenati, and 1 for ChamI.

Permanent regenerating callus lines were obtained in a "second phase". The subculture of call, from the "first phase", on the "differentiation" medium, maintained regeneration activity as well as proliferation in three cultivars. For Cocorit, 2 transfers were made, through which 6 plants were regenerated. For Isly 68 plants were obtained from 9 transfers, and for Jori 433 plants were regenerated from 10 transfers. From the two phases, a total of 698 plants were regenerated, all chlorophyllian and mostly haploid. Isly and Jori callus lines maintained for about one year, opening the possibility for either direct, or gradual stress applications. About 50 Jori regenerated plants issued from callus lines developing on salt containing media. The regenerated plants from the upper value of 9 g/L being obtained with the

<sup>1</sup> Faculté des Sciences de Tunis, Département des Sciences Biologiques, Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie

<sup>2</sup> ENSAIA/INPL, Amélioration Génétique et Biotechnologies, 2, ave. de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre, France

<sup>3</sup> Biologie Appliquée, Université Hassan I, BP 577, Faculté des Sciences et Techniques, 2600 Settat, Maroc

gradual introduction of salt.

The selfed progenies of controls (90 for Isly, 22 for Jori and 1 for Cocorit) were obtained as well as from plants regenerated on 5 g/L of salt containing medium (11 for Isly).

Key words: vitrovariant, somaclonal variability, salt tolerance regenerating plants, *Triticum durum*, gynogenesis, haploid.

**Résumé:** De façon à obtenir des souches régénérantes de blé dur (*Triticum durum*) susceptibles d'être soumises in vitro à des pressions stressantes, une technique de gynogenèse a été élaborée sur 6 variétés, Cocorit, Isly, Jori, Oued Zénati, Sarif, et Cham1, provenant du Maghreb et du Moyen-Orient.

Les résultats de gynogenèse présentés, concernent la mise en culture de 4.786 ovaires, au cours de 2 expérimentations. Les épis sont prélevés lorsque le pollen est bi- ou trinué, et ils subissent un prétraitement à 4°C (de 7, 11, ou 15 jours) avant d'être stérilisés et disséqués, pour en extraire les ovaires non fécondés. Après 4 à 9 semaines de culture à l'obscurité sur milieu d'induction (A et B ont été comparés), les cals qui font éclater les ovaires sont transférés sur milieu de différenciation (DIFF). Les bourgeons qui apparaissent 6 semaines après, sont placés sur un milieu de développement (DEV), pour donner des plantes haploïdes.

A l'issue de cette phase "primaire", on constate que le plein été est la saison la plus efficace à l'utilisation des ovaires. Les meilleurs taux de régénération, pour 100 ovaires mis en culture, apparaissent chez Isly (21,8%) avec 7 jours de prétraitement et le milieu d'induction A (7j, /A), chez Cocorit (15j, /A) ce taux est de 18,1%, tandis que chez Jori trois des conditions donnent des résultats positifs: (7j, /B) avec 9,3%, (7j, /A) avec 16% et (11j, /B) avec 17,1%. Pour les 2 expérimentations, 149 plantes ont été obtenues, et un total de 191 pour l'ensemble des travaux.

L'entretien de l'activité régénératrice, associé à une prolifération des cals, a été obtenu par repiquages successifs sur le milieu DIFF. Des plantes complémentaires ont ainsi été générées. Pour Cocorit, les 2 repiquages, n'ont donné que 6 plantes, pour Isly, 9 repiquages ont donné 68 régénérants, tandis que Jori, après 10 repiquages (maintien de plus d'une année) a généré 433 plantes. Pour les 700 plantes issues des 2 phases, aucun albinisme n'a été observé et il apparaît peu de doublements spontanés des chromosomes.

Le maintien des souches a amené aussi la possibilité d'introduire un agent stressant (NaCl) dans le milieu de culture in vitro, de façon directe ou progressive, lors des repiquages. Chez Jori, près d'une cinquantaine de plantes ont ainsi été régénérées, en présence de doses de sel allant jusqu'à 9g/L; les vitroplants issus des doses les plus contraignantes proviennent de l'application graduelle du stress salin.

Plus d'une centaine de régénérants "témoins", de même que 11 vitroplants Isly issus de milieux contenant 5 g/L de sel ont donné une descendance. De façon à tester l'intérêt de la méthode d'obtention, leur comportement pourra être comparé en conditions expérimentales de stress in situ.

Mots-clés: vitrovariants, variation somaclonale, tolérance au sel, régénérants, *Triticum durum*, gynogenèse, haploïdie

## INTRODUCTION

Dans les pays du Maghreb et du Moyen-Orient, l'aridité et les fortes teneurs en sel sont des facteurs limitants de la production végétale. Dans ces régions, le blé dur est largement utilisé dans l'alimentation humaine mais les surfaces actuellement utilisables pour la production locale sont insuffisantes. Le choix d'une technologie de création d'un matériel végétal tolérant aux sels, notamment au chlorure de sodium, permettrait d'étendre les aires de cultures et d'assurer une meilleure suffisance alimentaire.

### POURQUOI LES BIOTECHNOLOGIES ?

#### *Sélection in situ et criblage in vitro*

En complément de la sélection classique en champ, différentes voies biotechnologiques ont pour objet d'augmenter les potentialités de tolérance ou de résistance

aux stress. Peut-on en attendre une rediversification originale ou spécifique d'un stress donné, différente de ce qui existe déjà in situ ? Dans une population naturelle c'est la plante, dans son intégralité qui fait face aux pressions sélectives; le criblage est effectué à un niveau global. Il en résulte une diversité et un modelé spécifique, impliquant des cibles biologiques et physiologiques, ainsi que les bases génétiques classiques correspondantes. Mais, in vitro, ce sont les cellules ou les fragments d'organes, libérés des contraintes rencontrées dans la plante entière, qui constituent la cible des pressions, avec un impact, au niveau d'éléments biologiques et de systèmes génétiques, qui peuvent différer de ceux évoqués précédemment, tant au plan de la localisation que de la régulation. La gamme des variants ainsi générés devrait différer de ceux sélectionnés in situ (1).

### *Variants orientés par culture in vitro*

Une rediversification fondamentale des bases biologiques et génétiques peut apparaître, après régénération in vitro de cals provenant de tissus végétaux tant somatiques (2) que gamétophytiques (3, 4). Il en résulte une "vitrovariation" ou "variation somaclonale", expression de la malléabilité des cellules cultivées in vitro.

Simultanément à cette phase, l'application de facteurs de contraintes permet soit un "criblage" des cellules avec élimination naturelle des non tolérantes, soit une "adaptation" avec évolution des potentialités de base (sans élimination), orientant ainsi la variabilité des régénérants vers une résistance ou une tolérance aux pressions imprimées. La régénération de plantes entières, à partir de cals placés en conditions de stress, pourrait dès lors fournir un matériel végétal présentant les caractéristiques de tolérance exprimées par les cellules mères de ces plantes.

### *Pression stressante graduelle ou brutale*

L'application brutale d'agents sélectifs pendant la culture in vitro de tissus végétaux, a déjà montré des résultats positifs chez le riz (5) et le blé tendre (6). Mais il est vraisemblable qu'un stress aussi direct (7) criblera des mutations simples, qui peuvent aisément être révertées ou contournées, alors qu'une pression appliquée progressivement devrait entraîner une adaptation faisant appel à une multiplicité de cibles ou de régulations biologiques, aux bases génétiques diversifiées, présentant donc une meilleure stabilité (1).

L'utilisation de conditions sublétales, augmentant graduellement à chaque étape successive de repiquage, devrait éliminer toute cellule inadaptée ou en bloquer la division, tandis que les autres se multiplient; ceci aboutissant à des souches résistantes ou tolérantes, vis-à-vis de fortes pressions de l'agent stressant (1). Des régénérants pourront être obtenus dans ces conditions: des données existent chez l'orge (8) et, quel que soit le processus d'application du stress, des propriétés de tolérance (conférées aux régénérants) peuvent se retrouver chez les descendants (5, 9).

Par ailleurs, les limites, quant à l'intensité de la pression, liées à la létalité des cellules lors d'une application brutale, devraient aussi pouvoir être reculées par l'augmentation graduelle du stress. On peut d'ailleurs se demander si l'intensité de la pression appliquée in vitro doit être de même niveau qu'in situ, pour une amélioration équivalente de la tolérance.

### *Quel outil des biotechnologies?*

Au premier chef, depuis quelques décennies, la culture de gamétophytes et la production consécutive de plantes haploïdes intéresse les créateurs de variétés chez les espèces autogames. En effet, cette voie, après doublement des chromosomes, donne immédiatement des structures génétiques parfaitement fixées.

Cependant, lors de la culture de souches cellulaires sous forme de cals, la vitrovariation apparaît de façon fréquente, et la culture de gamétophytes représente, en l'occurrence, une source de variabilité plus marquée (10, 11) que celle des cellules somatiques.

Il paraît donc logique d'utiliser cette première voie pour générer des variants.

La régénération par culture de gamétophytes donne des succès variables selon les espèces. Pour certaines (tabac, blé tendre, riz,...), l'androgenèse est une voie efficace; pour d'autres, elle n'aboutit pas ou, comme chez le blé dur, *Triticum durum*, elle est souvent associée à un albinisme indésirable des plantes régénérées (12). Ce défaut s'exprimant très rarement après gynogenèse, nous avons élaboré une technique de culture in vitro d'ovaires non fécondés (13, 14, 15) qui se révèle être une voie efficace comme source de plantes vertes haploïdes et comme source potentielle de vitrovariations en milieux stressants.

### *Gynogenèse du blé dur Triticum durum*

Chez les graminées, malgré le premier succès de gynogenèse in vitro chez l'orge par SAN NOEUM en 1976 (16), suivi d'autres auteurs (17, 18, 19), peu de succès ont été obtenus ultérieurement chez les autres céréales, mis à part le blé tendre (20, 21), le maïs (22) et le riz (23, 24).

Chez *T. durum*, c'est AÏSSA (25) qui obtint en 1977 les premières plantes haploïdes par androgenèse in vitro, mais les plantes chlorophylliennes restent rares chez cette espèce. D'autres blés tétraploïdes, tel *Triticum turgidum*, ont donné quelques résultats positifs en culture d'anthers (26), et pour résoudre le problème de l'albinisme, des croisements interspécifiques ont été pratiqués (27). Ici encore, peu de génotypes permettent un succès, et une grande quantité de matériel doit être manipulée, pour de faibles résultats. Ainsi, la gynogenèse, technique d'haploïdisation la plus efficace chez cette espèce, permettra d'étendre l'obtention d'haploïdes à un plus grand nombre de génotypes.

### TECHNIQUE D'HAPLOÏDISATION ET CRÉATION DE SOUCHES GÉNÉRANT DES VITROPLANTS EN CONDITIONS DE PRESSIONS SALINES.

Nous nous sommes tout d'abord attachés à établir, chez le blé dur, une technique de gynogenèse permettant d'obtenir, dans une phase de régénération dite "primaire", des plantes chlorophylliennes haploïdes (expérimentations 1 et 2). Les repiquages ultérieurs entraînent la création d'une souche permanente qui donne de nouveaux régénérants, dans une phase dite "secondaire" (13, 14, 15). Ces souches régénérantes pourront, le cas échéant, subir des transferts in vitro en conditions de stress salins, constituant une phase dite "stressante".

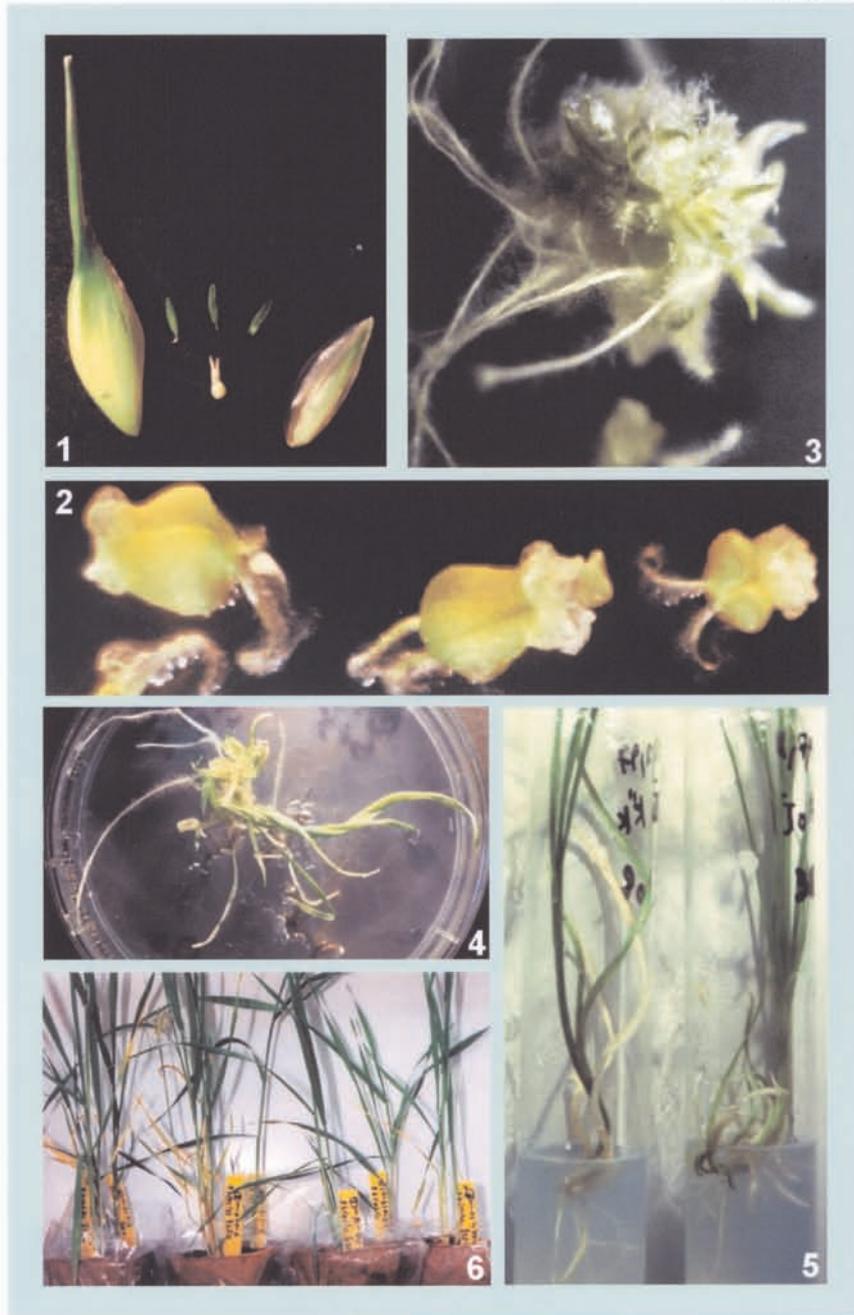
## MATERIEL ET METHODES

### Matériel Végétal

Le matériel végétal est constitué de 6 variétés de blé dur (*Triticum durum*) adaptées au climat du pourtour méditerranéen: **Cham 1, Cocorit, Isly, Jori, Oued-Zénati, Sarif**. La première est issue de l'ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Area), et les six dernières choisies pour leur très courte durée de vernalisation (moins d'une quinzaine de jours), proviennent de l'INRA-Maroc.

Après stérilisation, les grains sont placés dans des boîtes de Pétri de 10cm de diamètre, tapissées de papier filtre humide stérile, et stockées pendant une à deux semaines en pièce froide à 4°C et à l'obscurité. Après sortie du matériel à température ambiante (environ 22°C), mais toujours à l'obscurité, les grains germent et présentent en 4 jours un coléoptile de 3 à 4 cm et 2 à 5 racines primaires de 3 à 5 m.

Les plantules sont repiquées, individuellement dans des pots, contenant un mélange terreau/terre franche, et sont placées dans un phytotron P1 dont les conditions (14°±1°C le jour et 9° ± 1°C la nuit, avec une photopériode de 12 heures) permettent de générer le tallage. Après 5 semaines les plantes présentent environ 7 talles; la montaison est obtenue par transfert dans un phytotron P2 avec une photopériode de 16 heures et un accroissement de



1. Fleur de blé dur (*Triticum durum*) , après dissection, présentant les trois anthères et l'ovaire de 1.0 à 1.5 mm de long.  
Flower of durum wheat, after dissection, showing the three anthers and the ovary of 1.0 to 1.5 mm long.
2. Développement de cals faisant éclater la paroi des ovaires après quatre semaines de culture *in vitro* sur milieu d'induction.  
Calli bursting through the ovaries after 4 weeks of *in vitro* culture on induction medium
3. Régénération de bourgeons et de racines après repiquage de chaque cal issu d'ovaire sur milieu de différenciation.  
Regeneration of buds and roots after transfer on "differentiation" medium of each callus coming from ovaries.
4. Régénération "primaire" de plantes et de racines sur le milieu de développement.  
Regenerated plantlets and roots during the first transfert on culture medium.
5. Plantes issues de la culture d'ovaires non fécondés, placées sur milieu d'enracinement.  
Plantlets regenerated from unfertilized ovaries culture placed on "rooting" medium.
6. Régénérants gynogénétiques haploïdes doublés après transfert en sol.  
Doubled haploid regenerated plants from gynogenesis, transferred on soil.

température (25/18°±1°C). Des compléments nutritifs adéquats sont apportés régulièrement à toutes les phases du développement. Les épis atteignent le stade requis pour l'utilisation des ovaires après 7 à 9 semaines de séjour dans ces dernières conditions.

### Conditionnement des épis

Les talles portant les épis sont prélevés, avant l'anthèse, lorsque les anthères contiennent des microspores en majorité bi- ou trinuéées. La tige, placée dans de l'eau ordinaire, est maintenue à 4°C, à l'obscurité, soit pendant 7 jours (1ère expérimentation), soit pendant les durées de 7, 11, 15 jours (2ème expérimentation).

### Culture in vitro des ovaires non fécondés

Les épis, délicatement débarrassés de leur gaine, puis des barbes, sont stérilisés par immersion pendant 10 minutes dans une solution de Domestos à 10%, suivie de 3 rinçages à l'eau stérile. Pour leur mise en culture, les ovaires d'environ 1 à 1,5mm de long (Planche1, Photo 1), sont prélevés à l'aide d'une pointe fine stérile. Ils sont déposés horizontalement sur le milieu de culture, à raison de 15 à 20 unités par boîte de Pétri de 5,5 cm de diamètre. La pièce de culture (P3), où est stocké le matériel in vitro, a une température diurne de 27°±1°C et nocturne de 22°±1°C, avec une photopériode de 16 heures.

Deux expérimentations portant sur 1.036 et 3.750 ovaires, font partie d'un ensemble de travaux au cours desquels plus de 22.000 ovaires ont été mis en culture et dont le comportement a été observé. Elles ont été effectuées la même année, pour la première entre juin et la mi-juillet, et pour la seconde entre la mi-juillet et août.

Les ovaires sont mis en culture sur un milieu dit "d'induction" (les milieux A et B seront comparés) et, selon le génotype ou la saison, après stockage pendant 4 à 9 semaines à l'obscurité (boîtes cartonnées fermées), le transfert des cals obtenus (Planche1, Photo 2), est effectué vers un milieu de "différenciation"(DIFF)(Planche1, Photo3). Il est suivi, après environ 6 semaines, du repiquage des bourgeons générés sur un milieu de "développement" (DEV) (Planche1, Photo 4). L'enracinement des vitroplants a lieu sur milieu ENR après mise en tube (Planche1, Photo 5).

Tous les milieux (15) (tableau 1) diffèrent par les substances de croissances. La composition de A est basée sur le milieu de JÄHNE *et al.* (28) et celle de B sur celui de SAN NOEUM (16) après modifications dans les deux cas, les milieux DIFF et DEV ont la même base que A, mais ce dernier est débarrassé de substances de croissances, et pour le milieu ENR la base est diluée de moitié (14, 15).

### Souches régénérantes et application de stress salins

A la suite de la phase "primaire" de régénération, les transferts successifs des cals présentant des bourgeons ou/et des points verts sur milieu DIFF créent, dans une phase "secondaire", des souches régénérantes qui vont se maintenir au cours des repiquages. La phase "stressante" pourra alors être mise en place.

En conditions "témoin" l'entretien des souches s'effectue sur DIFF sans chlorure de sodium (0g/L), tandis que lors des stress, ce milieu est additionné de sel. L'introduction de sel, en quantité sublétales, est soit directe, soit graduellement augmentée à chaque repiquage par incrément de 2 g/L, depuis 3g/L jusqu'à 9g/L, correspondant donc à 3, 5, 7, et 9g/L. Les doses ont été établies après tests de plasmolyse et de létalité des cellules des souches cultivées in vitro.

Le stress direct a concerné 368 cals, tandis que 192 cals ont subi une application progressive. Au départ de la mise en place de la phase stressante, les lots traités comprennent de 30 à 80 cals.

Tous les bourgeons obtenus sur DIFF, avec ou sans stress salin, sont transférés sur DEV, sans addition de sel, de façon à permettre leur développement en plantes qui seront placées sur le milieu d'enracinement (ENR).

Tableau 1: Milieux de culture *in vitro*

Milieux	A	B	Dif	Dév	Enr
<b>MacroElém g/l</b>					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,165	0,160	0,165	0,825	0,080
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,440		0,440	0,220	0,165
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O		0,500			
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,370	0,072	0,370	0,185	0,180
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,170	0,170	0,170	0,085	0,085
KNO <sub>3</sub>	1,900	1,000	1,900	0,950	0,940
<b>MicroElém mg/l</b>					
KI	0,83	0,75	0,83	0,42	0,40
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	1,60	6,20	3,13	3,10
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	8,45	4,90	8,45	4,24	8,50
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8,60	7,90	8,60	4,30	4,30
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25		0,25	0,125	0,10
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025		0,025	0,013	0,125
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025		0,025	0,013	
<b>Vitamines mg/l</b>					
méso-inositol	100	100	100	100	50
acide nicotinique	1		0,5	1	
pyridoxine,HCl	1		0,5		
thiamine,HCl	1		0,1	5	
pyruvate,Na				5	
<b>Acides Aminés mg/l</b>					
glutamine	750		146	146	
hydrolysate de caséine		250			
glycine			2	2	
<b>Chélateur mg/l</b>					
FeEDTA	40	40	40	40	20
<b>Sucre g/l</b>					
maltose	60	90			
saccharose			30	30	20
<b>Agent gélifiant g/l</b>					
agar Difco	7	7	7	7	7
<b>Régulateurs mg/l</b>					
2,4-D	2	2	1		
ANA			1		
AIA				1	
kinétine	0,5				
BAP				2	
2AiP			0,1		
AiB					0,05
<b>ph</b>	5,8	5,9	5,8	5,8	5,8

**In vitro culture media**

A et B: induction; Dif: différenciation; Dév: développement; Enr: enracinement

**Prélèvement, développement et traitement des vitroplants**

Les vitroplants, présentant des tiges de 5 à 10cm de hauteur et un enracinement correct (de 2 à 6 racines de 3 à 5 cm de longueur), sont extraits du milieu gélosé, nettoyés à l'eau ordinaire et placés dans un mélange terreau/terre franche contenu dans des godets

"fertil pots" en tourbe. Une protection par film plastifié sera ôtée progressivement, afin d'éviter une dessiccation trop brutale; la mise en place dans P1 favorisera le tallage.

Les comptages chromosomiques sont effectués sur les pointes de racines de 1 cm, en cours d'élongation, après coloration selon la technique de Feulgen.

Pour effectuer le doublement chromosomique, les vitroplants haploïdes vigoureux sont extraits du substrat, rincés et les racines et feuilles inutiles sont éliminées; le plateau de tallage est alors trempé pendant 4 heures dans une solution de colchicine à 0,05% contenant du DMSO à 10% et 100 mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, le pH étant ajusté à 5,7; un éclaircissement intense est fourni pendant tout le traitement. Le rinçage à l'eau courante dure une nuit complète.

Après transfert des plantes dans P2 le développement d'épis fertiles produit une descendance dans 80% des cas (Planche1, Photo 6).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Gynogenèse

Les données (tableaux 2 et 3) ont été distinguées selon que l'induction d'un cal dans chaque ovaire a été occasionnée sur le milieu A ou sur le B. Tous les taux sont présentés pour

Tableau 2: Production de plantes par gynogenèse chez le blé dur.

Milieu d'Induction (Fj= 7)		A					B				
G é n o t y p e		Cocorit	Isly	Jori	Oued Z	Sarif	Cocorit	Isly	Jori	Oued Z	Sarif
7	effectif										
	Ov	84	60	79	69	66	186	105	111	126	150
	Ov*	16	15	11	23	9	21	22	26	21	31
	Pl	0	0	2	7	0	0	15	2	0	0
	%										
	Ov*/Ov	19,0	25,0	15,9	40,5	24,2	11,3	20,9	23,4	17,4	20,6
	Pl / Ov*	0	0	18	30	0	0	68	8	0	0
	Pl / Ov	0	0	2,9	10,1	0	0	14,3	1,8	0	0

Production of plantlets through gynogenesis in durum wheat.

Symboles : A et B : milieux d'induction; Oued Z: Oued Zénati  
 Fj: nombre de jours à 4°C avant mise en culture;  
 Ov: ovaire; Ov\*: ovaire réactif; Pl: plante; %: pourcent;  
 / A: sur milieu d'induction A  
 DIFF: milieu de différenciation DEV: milieu de développement  
 ENR: milieu d'enracinement

Remarques: Sont notées en caractères gras les valeurs de Ov\*/Ov>15,0%,  
 de Pl/Ov\*>50%, et de Pl/Ov>9%.

Les taux Pl/Ov\*, sont arrondis à l'unité supérieure.

cent ovaires mis en culture, ou pour cent ovaires réactifs (ovaires générant un cal).

Les 5 génotypes de la première expérimentation ont tous subi 7 jours de prétraitement au froid à 4°C. Le tableau 2 montre pour tous les génotypes et pour chacun des 2 milieux d'induction, des taux élevés d'ovaires réactifs (Ov\*/Ov). Sur A les valeurs sont comprises entre 15,9% pour **Jori** et 40,5% pour **Oued Zénati**, et sur B entre 11,3% pour **Cocorit** et 23,4% pour **Jori**.

**Oued Zénati** (/A) et **Isly** (/B) donnent les fortes valeurs, de 10,1% et 14,3%, en taux de plantes (Pl/Ov) pour cent ovaires mis en culture. Pour les cas non suivis de régénération de plantes, il est à supposer, que les phases ultérieures à l'induction ne sont pas optimisées, ou encore que le prétraitement n'a pas préparé le matériel à une bonne évolution.

Dans la seconde expérimentation (tableau 3) les effets de trois durées de prétraitement au froid (7, 11 et 14 jours), ainsi que des deux milieux d'induction A et B, sont analysés.

Tableau 3: Production de plantes par gynogenèse, chez le blé dur

Milieu d'Induction (Fj= 7)		A					B				
G é n o t y p e		Cham1	Cocorit	Isly	Jori	Sarif	Cham1	Cocorit	Isly	Jori	Sarif
7	effectif Ov	150	120	159	150	66	150	120	147	162	60
	Ov*	6	21	47	35	12	3	5	37	27	1
	Pl	0	0	1	24	0	1	0	32	15	0
	%										
	Ov*/Ov	4,0	17,5	29,6	23,3	18,2	2,0	4,2	25,2	16,7	1,7
	Pl / Ov*	0	0	2,1	69	0	33	0	87	56	0
	Pl / Ov	0	0	0,6	16	0	0,6	0	21,8	9,3	0
11	effectif Ov	120	105	102	105	108	135	195	120	141	120
	Ov*	2	22	25	26	32	7	18	22	10	12
	Pl	0	0	1	18	0	0	0	0	3	0
	%										
	Ov*/Ov	1,7	21,0	24,5	24,8	29,6	5,2	9,2	18,3	7,1	10,0
	Pl / Ov*	0	0	4	69	0	0	0	0	30	0
	Pl / Ov	0	0	0,9	17,1	0	0	0	0	2,1	0
15	effectif Ov	150	105	99	150	75	135	96	144	165	96
	Ov*	6	16	23	30	15	5	10	15	16	25
	Pl	0	19	0	6	0	0	0	4	0	0
	%										
	Ov*/Ov	4,0	15,2	23,2	20,0	20,0	3,7	10,4	10,4	9,7	26,0
	Pl / Ov*	0	119	0	20	0	0	0	27	0	0
	Pl / Ov	0	18,1	0	0	0	0	0	2,8	0	0

Production of plantlets through gynogenesis in durum wheat.

Symboles : A et B : milieux d'induction; Oued Z: Oued Zénati  
 Fj: nombre de jours à 4°C avant mise en culture;  
 Ov: ovaire; Ov\*: ovaire réactif; Pl: plante; %: pourcent;  
 / A: sur milieu d'induction A  
 DIFF : milieu de différenciation DEV : milieu de développement  
 ENR : milieu d'enracinement

Remarques: Sont notées en caractères gras les valeurs de Ov\*/Ov>15,0%,  
 de Pl/Ov\*>50%, et de Pl/Ov>9%.  
 Les taux Pl/Ov\*, sont arrondis à l'unité supérieure.

La partie du tableau 3, concernant la durée de 7 jours de prétraitement à 4°C, peut être comparée, pour les génotypes communs aux deux expérimentations, avec les données du tableau 2. On note alors, pour **Isly**, un comportement analogue vis-à-vis des milieux d'induction, ainsi qu'une sensible amélioration des valeurs sur milieu B, tant en taux d'ovaires réactifs (+5%), que pour celui de plantes (+7 à 8%, au seuil de 5%). Le génotype **Cocorit**, ne donne pas ici davantage de résultats en plantes et, sur le milieu B, a même de plus faibles valeurs en ovaires réactifs (4,2% contre 11,3%, précédemment). Par contre, **Jori** présente une nette amélioration des taux de plantes, passant de 1,8 à 9,3% (+7,5%) sur B, et de 2,9 à 16% (+13,1%) sur A, différences toutes deux significatives statistiquement (=5%). Cette amélioration des résultats de l'expérimentation 2 vis-à-vis de 1, est peut être à associer avec un meilleur état des ovaires, lors de la mise en culture (juillet-août). Autrement dit, la saison pendant laquelle le végétal s'est développé (printemps-été) semble avoir joué un rôle déterminant sur le niveau de réussite.

Sur l'ensemble du tableau 3, les taux maximum de plantes (Pl/Ov) sont obtenus pour **Isly** avec 21,8% (7j, /B), pour **Cocorit** avec 18,1% (15j, /A), et pour **Jori** avec les valeurs de

17,1% (11j, /A), 16% (7j, /A) et 9,3% (7j, /B). Le géotype **Cham1** donne un très faible taux de réussite de 0,6% (7j, /B), et **Sarif** ne génère aucune plante.

Les géotypes interagissent fortement avec la durée de prétraitement et le milieu d'induction. Le déroulement correct des étapes amenant à la régénération de plantes, est donc obtenu avec un milieu d'induction et une durée de prétraitement au froid, spécifique de chaque géotype. Le milieu A convient pour **Cocorit** (15j) et pour **Jori** (7j, et 11j) (tableau 3), de même que pour **Oued Zénati** (tableau 2), tandis que B donne les meilleurs résultats avec **Isly** (7j), mais permet des réponses avec **Jori** (7j). Seul ce géotype présente une certaine malléabilité, avec des régénérations de plantes dans cinq des six situations du tableau 3, avec trois taux élevés (compris entre 9,3% et 17,1%).

Les taux d'ovaires réactifs montrent que le milieu A convient à 4 géotypes sur les 5 (seul **Cham1** réagit mal), tandis que B ne convient qu'à **Isly** (avec 25,2% 7j, 18,3% 11j et 10,4% 15j), **Jori** (avec 16,7% 7j), et **Sarif** (avec 26,0% 15j), les autres valeurs obtenues sont faibles (=10%). Les valeurs élevées, ne sont cependant pas toujours suivies de forts taux de plantes: **Isly** (7j, /A) avec  $Ov^*/Ov = 29,6\%$  aboutit à un taux de plantes de 0,6%; **Sarif**, pour lequel les valeurs  $Ov^*/Ov$  atteignent 29,6% (11j, /A) et 26% (15j, /B) ne donne aucune plante. Inversement, **Cocorit** (15j, /A) qui ne donne que 15,2% d'ovaires réactifs, voit chacun d'eux générer une plante ou plus ( $Pl/Ov^* = 119\%$ ), et  $Pl/Ov = 18,1\%$ .

Au cours de ces 2 expérimentations, cette phase "primaire" de régénération a permis d'obtenir 149 plantes. Cependant, pour l'ensemble des géotypes et des tests réalisés au cours de l'élaboration de la technique, 191 plantes haploïdes chlorophylliennes ont été régénérées, regroupant 90 unités pour **Isly**, 74 pour **Jori**, 19 pour **Cocorit**, 7 pour **Oued Zénati** et 1 pour **Cham1**.

### Maintien des souches au cours des repiquages

Par repiquage des cals sur le milieu de différenciation (DIFF), le bourgeonnement a pu être entretenu, créant alors des souches qui maintiennent leur pouvoir de régénération en donnant des plantes supplémentaires, dans une phase de repiquages dite "secondaire". La stabilité de telles souches dépend du géotype.

Si **Cocorit** ne s'est maintenu que pendant 2 transferts successifs, en donnant 6 plantes, **Isly** est passé au travers de 9 repiquages produisant 68 plantes et **Jori** en a subi 10, sur une période de 12 mois, générant 433 plantes complémentaires à celles obtenues lors de la phase "primaire".

### Régénération des souches en conditions de stress salin

Pour **Cocorit**, **Isly** et plus particulièrement pour **Jori**, la régénération a été suivie lors de l'application, soit directe, soit progressive, de stress salins, en comparaison avec l'entretien de souches témoins, cultivées sur milieu DIFF sans sel. Soulignons que pour le témoin, de même que pour la dose de sel de 3 g/L, il ne peut y avoir d'adjonction progressive de l'agent contraignant.

Pour **Jori**, le 3ème repiquage sur le milieu témoin DIFF donne un taux de régénérants par cal (24,4%) qui ne diffère pas statistiquement de celui obtenu avec 3g/L (27,3%). Avec les quantités plus importantes de sel, lors d'une introduction progressive, les taux de plantes tendent à être supérieurs à ceux observés lors des applications directes. Ainsi, pour la valeur de 5 g/L, le taux de régénérants passe de 7,9% dans l'application directe, à 18,5% lors du traitement graduel. Pour la dose de 7 g/L, on passe de 1,8 à 3,6% et pour 9g/L, seul le traitement progressif permet la survie de la souche et l'obtention de plantes. Il faut noter cependant, qu'il y a interférence avec la diminution du nombre de cals utilisables à mesure des repiquages, par perte de l'activité régénératrice.

Au cours de cette phase, les 3 variétés ont donné une centaine de régénérants (dont 48 pour **Jori**) en conditions de stress salins allant de 3 à 9 g/L, que l'application ait été directe ou progressive. Cependant, il est important de souligner qu'après une série de transferts in vitro,

quel que soit le génotype, les souches se sont montrées fragilisées, même pour le milieu témoin. Il paraît donc judicieux d'entreprendre cette phase de traitement salin assez rapidement au cours de l'établissement de la souche régénérante, de façon à ce qu'elle ne s'épuise pas avant l'obtention des plantes.

Tous les vitroplants sont chlorophylliens, et après doublement, soit spontané, soit artificiel des chromosomes, permettant de retrouver la fertilité du matériel, des descendances d'autofécondation (constituées par 1 à 56 grains) ont été obtenues, qu'il s'agisse de régénération témoin, sans stress salin (90 pour **Isly**, 22 pour **Jori**, 1 pour **Cocorit**), ou avec 5 g/L de sel dans le milieu (11 descendances pour **Isly**).

## CONCLUSIONS

Ces travaux montrent tout d'abord que chez le blé dur ce processus de gynogénèse s'avère être, à l'heure actuelle, la voie la plus efficace pour obtenir des plantes haploïdes chlorophylliennes en nombre. Les taux de plantes régénérées lors de la phase "primaire" sont les plus haut cités dans la littérature et les valeurs peuvent être encore augmentées par les régénérants "secondaires".

Selon chacun des six génotypes, le développement de cals dans les ovaires, et la régénération de plantes, a été obtenue après au moins l'une des trois durées de 7, 11 ou 15 jours de prétraitement des épis à 4°C, et en utilisant, lors de la mise en culture, l'un des deux milieux d'induction A ou B.

Il est à noter qu'après l'initiation des cals, le processus de culture in vitro ultérieur est identique et que tous sont placés sur un milieu de différenciation (DIFF), puis de développement (DEV) permettant l'élongation des bourgeons initiés.

Cet ensemble constitue la phase "primaire" de régénération à l'issue de laquelle, les deux expérimentations présentées, ont fourni 149 plantes. Les taux de réussite les plus élevés en régénérants primaires, pour 100 ovaires mis en culture, apparaissent pour le génotype **Isly** (7j, /B), avec des valeurs de 14,3% pour la première expérience et de 21,8% pour la seconde.

La saison de mise en culture et corrélativement, la période de développement des plantes paraît être déterminante. La plus favorable, au moment du prélèvement des épis, étant le plein été: **Jori** qui ne donnait pratiquement aucun résultat au printemps donne en été des réponses régulières avec les taux maximum de plantes pour le milieu A, que le prétraitement au froid soit de 7 jours (16%) ou de 11 jours (17,1%). Pour la plupart des génotypes, tel **Cocorit**, dont le meilleur taux de plantes est de 18,1% (15j, /A), la réponse est spécifique d'une durée de prétraitement des épis à 4°C et du milieu d'induction.

Cinq des génotypes sur les six utilisés ont donné des résultats et sur l'ensemble des expérimentations réalisées, 191 plantes haploïdes ont été obtenues. **Isly** et **Jori** paraissent les plus productifs, et seul **Sarif** n'a donné ici aucun régénérant, malgré un taux élevé d'ovaires réactifs et d'initiation de bourgeons.

Pour trois des génotypes, et plus particulièrement pour **Jori**, la phase "secondaire" sans stress salin a entraîné, par repiquage des cals sur le milieu DIFF, l'entretien des processus à la fois de division cellulaire et de régénération. Cette phase, inhabituelle en haplodiploïdisation, a permis de générer des plantes additionnelles. Au cours de 2 à 9 ou 10 repiquages, soit une année complète, plus de 500 régénérants complémentaires (dont 433 pour **Jori**) ont été obtenus, amenant sur l'ensemble des deux phases à un total de près de 700 plantes.

Pour **Isly**, **Jori** et **Cocorit**, le maintien de la survie des souches a permis d'introduire l'agent stressant (NaCl) dans le milieu de culture in vitro, de façon directe ou progressive, lors des repiquages. Pour **Jori**, près d'une cinquantaine de plantes se sont ainsi développées, en présence de doses de sel allant jusqu'à 9 g/L dans le milieu, la régénération avec les doses les plus contraignantes ayant été obtenue lors de l'application graduelle du stress salin.

Le doublement des chromosomes des vitroplants a permis de restituer la fertilité et d'obtenir les descendances d'autofécondation de régénérants, qu'ils soient témoins (90 pour **Isly**, 22 pour **Jori** et 1 pour **Cocorit**), ou provenant de milieu contenant 5 g/L de sel (11 pour **Isly**).

Ces expériences seront poursuivies de façon à obtenir des régénérants sur des milieux contenant des doses de sel plus élevées. Le comportement des descendances successives sera alors observé in situ en conditions de tests salins, comparablement aux travaux déjà effectués chez le blé tendre (6) ou l'orge (9). On peut espérer pour le blé dur des réactions similaires, et le maintien in situ de l'amélioration de la tolérance obtenue in vitro.

Il sera alors possible de voir si la phase stressante a permis, soit un criblage des cellules tolérantes, soit leur adaptation (1, 29), s'il y a eu passage des potentialités au niveau des bourgeons puis des vitroplants, et de vérifier s'il y a transmissibilité héréditaire de ces potentialités (30, 31). Les analyses en croisements diallèles pourront aussi donner accès au compartiment cellulaire impliqué dans les comportements observés (2, 11, 32). L'ensemble permettra de statuer quant à l'intérêt de la technique qui pourrait être alors utilisée tant au niveau d'autres espèces que relativement à d'autres types de stress.

## BIBLIOGRAPHIE

- AÏSSA K.(n°25) Obtention de plantes haploïdes chez *Triticum durum* par voie androgénétique in vitro. Thèse de 3ème Cycle, Univ Paris-Sud, Centre d'Orsay; **1977**: 132 p
- ASSELIN DE BEAUVILLE M.(n°23) Obtention d'haploïdes in vitro à partir d'ovaires non fécondés de riz, *Oryza sativa* L. C R Acad Sci (Paris) **1980**; 296 D: 489-492.
- BARAKAT MN, EL-HARIS MK.(n°6) In vitro selection for salt-tolerant lines in wheat. III. Agronomic evaluation of the progeny under salt stress conditions. *Alex J Agric Res* **1998**; 43: 2, 21-32.
- BARAKAT MN, ABDEL-LATIF TH. (n°7) In vitro selection of wheat callus tolerant to high level of salt and plant regeneration. *Euphytica* **1996**; 91: 127-140.
- BERTIN P, BUSOGORO J-P, TILQUIN J-P, KINET J-M, BOUHARMONT J.(n°5) Field evaluation and selection of rice somaclonal variants at different altitudes. *Plant Breeding* **1996**; 115: 183-188.
- BURK LG, MATZINGER DF.(n°3) Variation among anther-derived doubled haploids from an inbred line of tobacco. *J Hered* **1976**; 67: 381-384.
- CASTILLO AM, CISTUÉ L.(n°18) Production of Gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Rep* **1993**; 12: 139-143.
- JÄHNE A, LAZZERI M, JÄGER-GUSSEN M, LÖRZ H.(n°28) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* **1991**; 82: 74-80.
- JAIN SM.(n°29) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* **2001**; 118: 153-166.
- GHAEMI A, SARRAFI A, ALIBERT G.(n°26) Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Euphytica* **1993**; 65:81, 81-85.
- KOBAISSI A.(n°14) Gynogenèse en conditions de stress salin, source de vitrovariation orientée, pour la création de tolérance à la salinité chez l'orge (*Hordeum vulgare*) et le blé dur (*Triticum durum*). Doct INPL, Option Génét. et Biotechno. 54505 Vandœuvre, **2001**: 190 p.
- MANDAL AB, PRAMANIK SC, CHOWDHURY B, BANDYOPADHYAY AK.(n°30) Salt-tolerant Pokkali somaclones: performance under normal and saline soils in Bay Islands. In: Elsevier éd. *Field Crops Research*. : **1999**; 61: 13-21.
32. NZIENGUI H.(n°32) Variabilité après culture in vitro de gamétophytes chez deux céréales -Analyse de descendances d'haplodiploïdes d'orge (*Hordeum vulgare*) en conditions de stress salin in situ. Obtention de régénérants en présence de sel après gynogenèse chez le blé dur (*Triticum durum*)-Doct INPL, Option Génét. et Biotechno. 54505 Vandœuvre, **2004**: 144 p.
- SAN NCEUM LH.(n°4) Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. *Ann Amélior Pl* **1976**; 26:4, 751-754.
- SAN NCEUM H, AHMADI N.(n°16) Variability of doubled haploïds from in vitro androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. In: ED Earle, Demarly Y éd. *Variability in Plants Regenerated From Tissue Culture*. New York: Praeger, **1982**: 273-283.
- SARRAFI A, AMRANI N, ALIBERT G.(n°27) Haploid regeneration from tetraploid wheat using maize pollen. *Genome* **1994**; 37: 176-178.
- SIBI ML, FAKIRI M.(n°8) Androgenèse et gynogenèse in vitro, sources de vitrovariation et de tolérance à l'aridité chez l'orge *Hordeum vulgare*, sécheresse **2000**; 2: 11, 125-132.

- SIBI ML, KOBAISSI A, MACHLAB H, FAKIRI M.(n°9) Analyse de la tolérance à la salinité chez les descendances de plantes gynogénétiques d'orge (*Hordeum vulgare*), régénérées en conditions de stress salins. In: AUPELF-UREF ed. "Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes". Montpellier, 3-5 juillet 2000. Paris: John Libbey Eurotext, **2000**.
- SIBI ML, FAKIRI M.(n°11) Vitrovariation chez des orges (*Hordeum vulgare*) issues d'haplodiploïdisation. Analyse des  $\beta$  amylases chez les croisements diallèles. In: AUPELF-UREF éd. Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Paris: John Libbey Eurotext, **1994**: 337-344.
- SIBI ML, KANDIL M.(n°10) Marqueurs biochimiques de la vitrovariation chez l'orge (*H. vulgare*). In: AUPELF-UREF éd. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes? Paris: John Libbey Eurotext, **1993**: 283-299.
- SIBI ML.(n°1) Vitrovariation, potentialités nouvelles et sélection in vitro. In: AUPELF°UREF éd. Biotechnologies Végétales. Rennes: CNED, **1996**:7-54.
- SIBI M.(n°2) La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs II - Aspect expérimental. Obtention de variants par culture de tissus sur *Lactuca sativa* L. Apparition de vigueur chez les croisements. *Ann Amélior Pl* **1976**; 26: 4, 523-547.
- SIBI ML, SHEKAFANDEH A. Gynogenèse in vitro du blé dur (*Triticum durum*) dans le cadre d'une création de tolérance à l'aridité: souches régénérant des plantes vertes. In: AUPELF-UREF éd Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaire. Orsay, 30 juin-03juillet 1997, Paris: John Libbey Eurotext, **1999**: 556-557.
- SIBI ML, KOBAISSI A, SHEKAFANDEH A.(n°15) Chlorophyllian haploid plants and regenerating strains by in vitro ovaries culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Defs.). *Euphytica* **2001**; 122: 351-359.
- SIBI ML, FAKIRI M.(n°19) Gynogenèse chez des génotypes marocains d'orge (*Hordeum vulgare*). In: AUPELF-UREF éd. Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Paris: John Libbey Eurotext, **1994**: 337-344.
- TRUONG-ANDRÉ I, DEMARLY Y.(n°22) Obtaining plants by in vitro culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant. *Z Pflanzenzücht* **1984**; 92: 309-320.
- WANG CC, KUANG BJ.(n°17) Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. *Acta Bot Sin* **1981**; 23: 329-330.
- ZHOU C, YANG HY.(n°24) In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. *Acta Genet Sin* **1980**; 7: 287-288.
- ZHU ZQ, WANG JJ, SUN JS.(n°12) The induction of albinos pollen plants and preliminary observation of heir ploidy in *Triticum durum*. *Acta Bot Sin* **1979**; 21: 295-298.
- ZHU Z, WU H.(n°20) In vitro production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. *Acta Genet Sin* **1979**; 5: 181-183.
- ZHU ZC, WU HS, AN QK, LIU ZY.(n°21) Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* cultured in vitro. *Acta Genet Sin* **1981**; 8: 386-390.
- ZHOU C, YANG HY. In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. *Acta Genet Sin* **1980**; 7: 287-288.
- ZHU GY, KINET J-M, LUTTS S.(n°31) Characterization of rice (*Oryza sativa* L) F3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behaviour during vegetative growth. *Euphytica* **2001**; 121: 261-265.